МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ (МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION (ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32042— 2012

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов группы В

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 004)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 3 декабря 2012 г. № 54–П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 304–ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32042—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2014 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Поправка к ГОСТ 32042—2012 Премиксы. Методы определения витаминов группы В

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРЕМИКСЫ
Методы определения витаминов группы В

Premixes.
Methods for determination of vitamin B complex

Дата введения — 2014—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на премиксы и устанавливает методы определения содержания витаминов группы В (B_1, B_2, холинхлорида, B_5).

Содержание витаминов B_1 и B_2 определяют методом измерения интенсивности флуоресценции, витаминов B_1, B_2 и B_5 – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, холинхлорида и витамина B_5 – колориметрическим методом.

Используемые методы обеспечивают сопоставимость результатов испытаний.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.2.007.0–75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 61–75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 246–76 Гидросульфит натрия технический. Технические условия

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603–79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4109–79 Реактивы. Бром. Технические условия

ГОСТ 4139–75 Реактивы. Калий роданистый. Технические условия

ГОСТ 4166–76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4174–77 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4201–79 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4204–77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4206–75 Реактивы. Калий железосинеродистый. Технические условия

ГОСТ 4234–77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4530–76 Реактивы. Кальций углекислый. Технические условия

ГОСТ 6016–77 Реактивы. Спирт изобутиловый. Технические условия

ГОСТ 6217–74 Уголь активный древесный дробленый. Технические условия

ГОСТ 6552–80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147–80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9337–79 Реактивы.Натрий фосфорно-кислый 12-водный. Техни-ческие условия

ГОСТ 9805–84 Спирт изопропиловый. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0–80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19908–90 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия

ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25664–83 Метол (4-метиламинофенол сульфат). Технические условия

ГОСТ 27067–86 Реактивы. Аммоний роданистый. Технические условия

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29228–91 (ИСО 835-2–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ 31218–2003 (ИСО 6498:1998) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Отбор проб

Отбор проб – по ГОСТ 13496.0.

4 Подготовка проб для испытания

Подготовка проб – по ГОСТ 31218.

5 Определение содержания витамина В1 (тиамина) методом измерения интенсивности флуоресценции

5.1 Сущность метода заключается в извлечении витамина B_1 (тиамина) из анализируемой пробы премикса раствором серной кислоты, окислении его раствором железосинеродистого калия в тиохром, экстракции окисленной формы из водной фазы изобутиловым спиртом и измерении интенсивности флуоресценции.

Метод применим в диапазоне измерений содержания витамина B_1 в премиксе от 50 до 5000 г/т.

Примечание – Данный метод не рекомендуется для определения содержания витамина B_1 в премиксах, выработанных на основе минерального наполнителя, который дает завышенную ошибку при измерении флуоресценции.

5.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Флуориметр любого типа с комплектом светофильтров и пределом допускаемой погрешности измерения от максимального значения шкалы ± 2 %.

Аппарат для встряхивания жидкости типа АВУ-1.

Колбы мерные 2-50(100)-1(2) по ГОСТ 1770.

Воронки стеклянные В-36(56)-50(80) ХС по ГОСТ 25336.

Пробирки П-1(2)-25-0,2 по ГОСТ 1770.

Воронки делительные ВД-1(2)-100 ХС по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1-100 ТХС по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные 4(5)-1(2)-1(2), 6(7)-1(2)-5(10) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Цилиндры 1(2, 3, 4)-25(50, 100) по ГОСТ 1770.

Фильтры обеззоленные (красная лента).

Кислота серная по ГОСТ 4204, раствор молярной концентрации $c(½\ H_2S0_4)$ = 0,1 моль/дм^3.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор в соотношении 1 : 1 по объему и раствор молярной концентрации c(НС1) = 0,01 моль/дм^3.

Калий хлористый по ГОСТ 4234.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 10 %.

Спирт изобутиловый по ГОСТ 6016.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166.

Калий железосинеродистый (красная кровяная соль) по ГОСТ 4206, раствор с массовой долей 1 %.

Хининсульфат или хининхлорид.

Витамин B_1 (тиаминхлорид гидрохлорид) с массовой долей не менее 99,0 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

5.3 Подготовка к испытанию

5.3.1 Приготовление окислительной смеси

1 $см^3$ свежеприготовленного раствора железосинеродистого калия смешивают с 49 $см^3$ раствора гидроокиси натрия.

Смесь готовят в день проведения испытания.

5.3.2 Приготовление основного стандартного раствора хининсульфата (или хининхлорида)

10 мг хининсульфата (или хининхлорида) растворяют в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$ в растворе серной кислоты и доводят этой кислотой объем до метки.

Срок хранения раствора холодильнике при температуре 4 °С – 5 °С в склянке из темного стекла – не более одного года.

5.3.3 Приготовление рабочего стандартного раствора хининсульфата (или хининхлорида)

1 $см^3$ основного стандартного раствора (см. 5.3.2) переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят объем до метки раствором серной кислоты.

Массовая концентрация рабочего раствора хининсульфата (или хининхлорида) - 1 $мкг/см^3$.

Раствор готовят непосредственно перед проведением испытания.

5.3.4 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_1

10 мг витамина B_1 растворяют в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$

в растворе соляной кислоты молярной концентрации $c(HC1)$ = 0,01 $моль/дм^3$

и доводят соляной кислотой объем до метки.

Массовая концентрация основного стандартного раствора витамина B_1 - 100 $мкг/см^3$.

Срок хранения раствора в склянке из темного стекла в прохладном месте – не более 1 мес.

5.3.5 Контроль за содержанием витамина B_1 в основном стандартном растворе проводят по 7.3.4.

5.3.6 Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_1

1 $см^3$ основного стадартного раствора витамина B_1 (см. 5.3.4) переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят дистиллированной водой объем до метки.

Массовая концентрация рабочего стандартного раствора витамина B_1 - 1 $мкг/см^3$.

Раствор готовят непосредственно перед проведением испытания.

5.4 Проведение испытания

Анализируемую пробу премикса массой от 2 до 5 г, взвешенную с записью результата до третьего десятичного знака, помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 5 г хлористого калия и приливают 70 $см^3$ раствора серной кислоты. Затем колбу с реактивами встряхивают на аппарате в течение 10 мин, доводят объем в колбе до метки раствором серной кислоты, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбросив первую порцию фильтрата. Переносят 2 $см^3$ фильтрата в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ и доводят раствором серной кислоты объем до метки.

Примечание – При необходимости допускаются другие разведения.

Отбирают 20 $см^3$ разбавленного фильтрата и переносят в делительную воронку, приливают 20 $см^3$ изобутилового спирта, тщательно перемешивают в течение 2 мин. После расслоения верхний слой сливают, а нижний - переносят в градуированную пробирку и доводят до объема 20 $см^3$ раствором серной кислоты, затем перемешивают.

Из пробирки берут 8 $см^3$ полученного раствора и переносят в делительную воронку, приливают 6 $см^3$ окислительной смеси (см. 5.3.1), перемешивают, добавляют 20 $см^3$ изобутилового спирта и встряхивают в течение 2 мин. После расслоения нижний (водный) слой отбрасывают, а верхний (спиртовый) – фильтруют через обеззоленный фильтр (красная лента), пропуская через слой безводного сернокислого натрия (4–5 г) во флуориметрическую пробирку и флуориметрируют.

Берут 8 $см^3$ рабочего стандартного раствора витамина B_1 (см. 5.3.6) и проводят его окисление, как с анализируемой пробой.

Для гашения флуоресценции в анализируемом и рабочем стандартном растворах к ним добавляют по 1–2 капли раствора соляной кислоты в соотно-шении 1 : 1 по объему, перемешивают и измеряют остаточную флуоресцен-цию.

Если в качестве рабочего стандартного раствора используют раствор хининсульфата (или хининхлорида), то его не окисляют и не гасят, т.к. он имеет одно и то же значение по флуориметру, равное 72.

По рабочему стандартному раствору хининсульфата (или хининхлорида) (см. 5.3.3) или витамина B_1 (см. 5.3.6) в соответствии с инструкцией настраивают флуориметр на деление шкалы 80.

5.5 Обработка результатов

Массовую долю витамина B_1 в премиксе, X, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot V \cdot V_2 \cdot m_1 \cdot 10^{-6}}{(F - F_1) \cdot m \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 10^{-6}}, \quad (1)$$

где A, A_1 – показания флуориметра для анализируемого раствора до и после гашения соответственно, усл. ед.;

V – первоначальный объем анализируемого раствора, $см^3$;

V_2 – объем фильтрата, взятый для разведения, $см^3$;

m_1 – масса витамина B_1 или хининсульфата (хининхлорида) в 8 $см^3$ рабочего стандартного раствора, мкг;

F, F_1 – показания флуориметра для рабочего стандартного раствора витамина B_1 до и после гашения соответственно, *усл. ед.;*

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

V_1 – объем разбавленного фильтрата, $см^3$;

V_3 – объем анализируемого раствора, взятый на испытание, 8 $см^3$;

10^{-6} – коэффициенты пересчета микрограммов в граммы и граммов втонну.

Примечание – При использовании в качестве рабочего стандартного раствора хининсульфата (хининхлорида) в расчетную формулу вместо выражения (F-F_1) подставляют цифру 72.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.1 настоящего стандарта.

6 Определение содержания витамина В2 (рибофлавина) методом измерения интенсивности флуоресценции

6.1 Сущность метода заключается в извлечении витамина B_2 (рибофлавина) из анализируемой пробы премикса путем кислотного гидролиза и измерении интенсивности флуоресценции.

Метод применим в диапазоне измерений содержания витамина B_2 в премиксе от 50 до 5000 г/т.

6.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Флуориметр любого типа с комплектом светофильтров и пределом допус-каемой погрешности измерения от максимального значения шкалы ± 2 %.

pH-метр любого типа с пределом допускаемой погрешности ± 0,1 ед. pH.

Баня водяная.

Центрифуга лабораторная с числом оборотов не менее 8000 в мин.

Фильтры обеззоленные (синяя лента).

Колбы мерные 2-50(100, 1000)-1(2) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 4(5)-1(2)-1, 6(7)-1(2)-25 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Цилиндры 1(2, 3, 4)-100 по ГОСТ 1770.

Кислота уксусная по ГОСТ 61.

Витамин B_2 (рибофлавин) с массовой долей не менее 99,0 %.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор с массовой долей 5 % и раствор молярной концентрации c(HC1) = 0,1 моль/$дм^3$.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 15 %.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 4201.

Натрия гидросульфит по ГОСТ 246.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Склянки из темного стекла.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

6.3 Подготовка к испытанию

6.3.1 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_2

40 мг витамина B_2 помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, добавляют до ½ объема дистиллированной воды, подкисленной 10 см^3 ледяной уксусной кислоты. Колбу нагревают на водяной бане при температуре до 50 °С до полного растворения витамина. Объем доводят дистиллированной водой до метки.

Массовая концентрация основного стандартного раствора витамина B_2 - 40 мкг/см^3.

Срок хранения раствора в склянке из темного стекла в прохладном, темном месте – не более 2 мес.

6.3.2 Контроль за содержанием витамина B_2 в основном стандартном растворе проводят по 7.3.4.

6.3.3 Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_2

1 см^3 основного стандартного раствора витамина B_2 (см. 6.3.1) переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой, подкисленной раствором соляной кислоты с массовой долей 5 % до 5,5-6,0 ед. pH.

Массовая концентрация рабочего стандартного раствора витамина B_2 – 0,4 мкг/см^3.

Раствор готовят непосредственно перед проведением испытания.

6.4 Проведение испытания

Анализируемую пробу премикса массой от 2 до 5 г, взвешенную с записью результата до третьего десятичного знака, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, приливают 75 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации c(HC1) = 0,1 моль/дм^3, смывая частицы премикса со стенок колбы. Колбу помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. Содержимое колбы периодически перемешивают.

После охлаждения колбы pH раствора доводят до значения 5,5–6,0 ед. pH раствором гидроокиси натрия. Затем объем в колбе доводят дистиллированной водой до метки, хорошо перемешивают и центрифугируют в течение 15 мин при 8000 об/мин.

Из полученного фильтрата готовят раствор с нужным разведением (например, 1 см^3 фильтрата разводят дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 50 см^3) и определяют интенсивность флуоресценции, помещая в одну флуориметрическую пробирку от 12 до 15 см^3 анализируемого раствора, в другую – такое же количество рабочего стандартного раствора витамина B_2 (см. 6.3.3). Затем в эти пробирки добавляют 2–3 раза по 0,1 г двууглекислого натрия и по 0,1 г гидросульфита натрия или 4–6 капель раствора гидроокиси натрия. Содержимое пробирок осторожно перемешивают, фильтруют, если раствор мутный, и снова измеряют интенсивность флуоресценции.

6.5 Обработка результатов

Массовую долю витамина B_2 в премиксе, X, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot C \cdot V \cdot V_2 \cdot 10^{-6}}{(F - F_1) \cdot m \cdot V_1 \cdot 10^{-6}}, \qquad (2)$$

где A, A_1 – показания флуориметра для анализируемого раствора до и послегашения флуоресценции соответственно, усл. ед.;

C – массовая концентрация витамина B_2 в рабочем стандартном растворе, мкг/см^3;

V – первоначальный объем анализируемого раствора, см^3;

V_2 – окончательный объем разведения анализируемого раствора, см^3;

F, F_1 – показания флуориметра для рабочего стандартного раствора витамина B_2 до и после гашения флуоресценции соответственно, усл. ед.;

m – масса анализиремой пробы премикса, г;

V_1 – объем анализируемого раствора, взятый для разведения, см^3;

10^{-6} – коэффициенты пересчета микрограммов в граммы и граммов втонну.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.1 настоящего стандарта.

7 Определение содержания витаминов В1 (тиамина) и В2 (рибофлавина) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

7.1 Сущность метода заключается в экстракции витаминов B_1 (тиамина) и B_2 (рибофлавина) из анализируемой пробы премикса раствором соляной кислоты и определении их содержания на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором с использованием обращенно-фазного режима элюирования.

Метод применим при содержании витамина B_1 в премиксе в диапазоне измерений от 50 до 500 г/т, витамина B_2 – в диапазоне измерений от 100 до 2000 г/т.

7.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный, укомплектованный спектрофото-метрическим детектором, пригодным для измерения оптической плотности при длине волны 254 нм, самописцем или интегратором, позволяющим измерять высоту и площадь пиков, и компьютером с установленным программным обеспечением для обработки результатов измерений.

Колонка хроматографическая стальная или стеклянная высотой 150 мм и диаметром 4 мм с числом теоретических тарелок не менее 2000, заполненная сорбентом «Силасорб С-18» или «Сепарон С-18».

Спектрофотометр со спектральным диапазоном от 186 до 1100 нм.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

pH-метр любого типа с пределом допускаемой погрешности ± 0,1 ед. pH.

Мешалка магнитная типа ММ-5.

Центрифуга лабораторная с числом оборотов не менее 6000 в мин.

Иономер со стеклянным электродом с пределом допускаемой погрешности ± 0,05 ед. pH.

Баня водяная.

Микрошприц или микропипетка.

Колбы конические со шлифом Кн-2-100-14/23 ТХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2-25(50, 100, 200)-1(2) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 6(7)-1(2)-10 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Воронка для фильтрования ВФ-1-56(75) ХС со стеклянным фильтром ФКП-56(75) ПОР 100 ХС или ВФ-2-75(110) ХС со стеклянным фильтром ФКП-75(110) ПОР 100 ХС по ГОСТ 25336.

Ацетонитрил с массовой долей не менее 99,98 %.

Натрия октилсульфонат, хроматографически чистый.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, концентрированная и раствор молярной концентрации $c(HCl)$ = 0,01 моль/дм^3.

Витамин B_1 (тиаминхлорид гидрохлорид) с массовой долей не менее 99,0 %.

Триэтиламин с массовой долей не менее 99,5 %.

Витамин B_2 (рибофлавин) с массовой долей не менее 99,0 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

7.3 Подготовка к испытанию

7.3.1 Приготовление элюента

В мерной колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают 700-800 см^3 дистиллированной воды и 120 см^3 ацетонитрила, добавляют 2,5 см^3 триэтиламина, 0,5 г октилсульфоната натрия и приливают ортофосфорную кислоту до pH равного 7,6 ед. pH. Объем доводят дистиллированной водой до метки. Полученную смесь фильтруют через стеклянный фильтр для удаления механических примесей.

Срок хранения элюента – не более 1 мес.

7.3.2 Приготовление раствора-экстрагента

В мерной колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают небольшое количество дистиллированной воды с 0,8 см^3 концентрированной (37 %–ной) соляной кислоты. Объем доводят дистиллированной водой до метки. pH раствора (2,0 ± 0,2) ед. pH.

7.3.3 Приготовление основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2

Для приготовления основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2 берут 0,1 г витамина B_1 и 0,01 г витамина B_2. Витамины растворяют в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане до температуры 70 °С – 80 °С в мерных колбах вместимостью 100 см^3 и 200 см^3 для витаминов B_1 и B_2 соответственно. Объемы в колбах доводят дистиллированной водой до метки.

Массовые концентрации основных стандартных растворов:

- витамина B_1 – 1 мг/см^3,
- витамина B_2 – 0,05 мг/см ^{3}.

Срок хранения основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2 в холодильнике при температуре 4 °С – 5 °С – не более 2 недель.

7.3.4 Контроль за содержанием витаминов B_1 и B_2 в основных стандартных растворах

Контроль за содержанием витаминов в основных стандартных растворах осуществляют спектрофотометрически по значениям молярных коэффициентов светопоглощения.

Для этого основные стандартные растворы (см. 7.3.3) разбавляют дистиллированной водой в объемном соотношении 1 : 49 и измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре в кювете толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Массовую концентрацию витамина B_1 или B_2, C, мг/см^3, в основных стандартных растворах вычисляют по формуле

$$C = \frac{C_{ст} \cdot V_2 \cdot \mathrm{D}}{V_1 \cdot E \cdot l}, \qquad (3)$$

где $C_{ст}$ – массовая концентрация витамина B_1 или B_2 в рабочем стандартном растворе, мг/см^3;

V_2 – объем разведенного стандартного раствора B_1 или B_2, см^3;

D – оптическая плотность витамина B_1 или B_2, е.о.п.;

V_1 – объем рабочего стандартного раствора витамина B_1 или B_2, взятый для разведения, см^3;

E – молярный коэффициент светопоглощения при рабочей длине волны268 нм для витамина B_1 и 445 нм для витамина B_2, значение которого соответственно 205 и 324 е.о.п./см;

l – толщина слоя раствора в кювете, см.

7.3.5 Приготовление рабочего стандартного раствора витаминов B_1 и B_2

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 1 см^3 и 25 см^3 основных стандартных растворов витамина B_1 и витамина B_2 (см. 7.3.3), объем доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Массовые концентрации витаминов в рабочем стандартном растворе составляют 20 мкг/см^3 – для витамина B_1 и 25 мкг/см^3 – для витамина B_2.

Рабочий стандартный раствор готовят в день проведения испытаний.

7.4 Проведение испытания

7.4.1 Экстракция витаминов B_1 и B_2

Для определения содержания витамина B_1 и B_2 в премиксе проводят два параллельных испытания, начиная со взвешивания анализируемой пробы.

(1,000 ± 0,002) г анализируемой пробы премикса помещают в коничес-кую колбу со шлифом вместимостью 100 см^3 и приливают 10 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации c(HC1) = 0,01 моль/дм^3.

Колбу ставят на магнитную мешалку с включением нагрева. Перемешивание и нагрев осуществляют в течение 10 мин. Полученную суспензию переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5000–6000 об/мин в течение 3 мин. Центрифугат сливают в мерную колбу вместимостью 25 см^3. Коническую колбу с остатком раствора ополаскивают небольшим количеством (4–5 см^3) раствора соляной кислоты молярной концентрации c(HC1) = 0,01 моль/дм^3, сливают раствор в центрифужную пробирку и снова центрифугируют. Центрифугат соединяют с первым в той же мерной колбе. Промывание центрифугированием повторяют 2–3 раза, каждый раз сливая промывные воды в ту же колбу. После этого раствор в мерной колбе доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Полученный раствор фильтруют или дополнительно центрифугируют для очищения от механических примесей и взвешенных частиц. Приготовленный раствор используют для хроматографирования.

7.4.2 Хроматографирование

Хроматографирование осуществляют при следующих условиях:

- колонка размером 4 × 150 мм, заполненная сорбентом;

- подвижная фаза – элюент (см. 7.3.1);
- рабочая длина волны спектрофотометрического детектора хроматографа – 254 нм;
- скорость элюирования – 1,2 $см^3$/мин;
- время удерживания для витамина B_1 составляет 6 мин, для витамина B_2 – 8 мин;
- объем загрузки анализируемого раствора – 10 $мм^3$.

Для насыщения колонки в начале работы проводят от трех до пяти загрузок рабочего стандартного раствора и отмечают высоты пиков. При достижении постоянной высоты можно приступить к испытаниям. Анализируемый раствор и рабочий стандартный раствор витаминов B_1 и B_2 хроматографируют каждый по три раза в одинаковых условиях и находят среднее арифметическое значение высот пиков (приложение А, рисунки А.1, А.2).

7.5 Обработка результатов

Массовую долю витамина B_1 или B_2 в премиксе, X, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{h_x C_{ст} V \cdot 10^{-6}}{h_{ст} m \cdot 10^{-6}}, \quad (4)$$

где h_x, $h_{ст}$ – высоты пиков витамина на хроматограммах экстракта изпремикса и рабочего стандартного раствора соответственно, е.о.п. или мм;

$C_{ст}$ – массовая концентрация витамина в рабочем стандартномрастворе (см. 7.3.5), мкг/$см^3$;

V – объем экстракта витамина из премикса (см. 7.4.1), $см^3$;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

10^{-6} – коэффициенты пересчета микрограммов в граммы и граммов втонну.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.1 настоящего стандарта.

8 Определение содержания холинхлорида колориметрическим методом

8.1 Сущность метода заключается в экстракции холинхлорида дистиллированной водой, образовании в присутствии трехзамещенного фосфата натрия комплекса рейнеката холинхлорида и колориметрическом измерении интенсивности окраски его ацетоновых растворов.

Метод применим в диапазоне измерений содержания холинхлорида в премиксе от 1000 до 100000 г/т.

8.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Фотоэлектроколориметр со спектральным диапазоном от 200 до 2000 нм или спектрофотометр со спектральным диапазоном от 186 до 1100 нм.

Насос вакуумный по ГОСТ 25336.

Колбы конические Кн-2-50(100)-14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Эксикатор вакуумный по ГОСТ 25336.

Стаканы химические В(Н)-1(2)-200(250) ХС по ГОСТ 25336.

Баня водяная.

Воронка ВФО-40-ПОР-16 (Шотта № 2) по ГОСТ 25336.

Аппарат для встряхивания жидкости.

Колбы конические с притертой пробкой Кн-2-100(250)-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2-25(100)-1(2) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 4(5)-1(2)-2, 6(7)-1(2)-5(10,25) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Цилиндр 1(2,3,4)-100 по ГОСТ 1770.

Фильтры обеззоленные (синяя лента).

Холинхлорид кристаллический с массовой долей не менее 98,0 %.

Спирт этиловый ректификованный технический объемной долей 96 % по ГОСТ 18300.

Натрий фосфорнокислый 12-водный по ГОСТ 9337, раствор с массовой долей 0,1 %.

Ацетон по ГОСТ 2603.

Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805.

Рейнекат аммония с массовой долей не менее 93 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

8.3 Подготовка к испытанию

8.3.1 Приготовление осаждающего реактива

2 г рейнеката аммония растворяют в 100 см^3 этилового спирта в конической колбе при нагревании на водяной бане при температуре (40 ± 2) °С в течение 20 мин. После охлаждения раствор фильтруют через обеззоленный складчатый фильтр.

Раствор готовят в день проведения испытания.

8.3.2 Приготовление стандартного раствора холинхлорида

0,1 г кристаллического холинхлорида высушивают до постоянной массы в вакуумном эксикаторе и растворяют его в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Доводят объем до метки дистиллированной водой.

Массовая концентрация стандартного раствора холинхлорида – 1 мг/см^3.

Допускается приготовление стандартного раствора из раствора холинхлорида с массовой долей 70 % с пересчетом на 100 %.

8.3.3 Построение градуировочного графика

В пять конических колб вместимостью 50 см^3 помещают 1, 2, 5, 7, 10 см^3 стандартного раствора холинхлорида, содержащих соответственно 1, 2, 5, 7 и 10 мг холинхлорида. В каждую колбу добавляют 10 см^3 раствора фосфорнокислого натрия и 5 см^3 раствора рейнеката аммония и далее проводят все испытания по 8.4.2. Интенсивность окрашенных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром или на спектрофотометре при длине волны 526 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно ацетона и на основании его показаний строят градуировочный график, откладывая по оси абсцисс соответствующие массы холинхлорида в каждом стандартном растворе в миллиграммах, а по оси ординат - показания прибора.

Градуировочный график контролируют каждый раз перед выполнением испытания. Для этого готовят 1-2 стандартных рабочих растворов холинхлорида, добавляя в каждую колбу 10 см^3 раствора фосфорнокислого натрия и 5 см^3 раствора рейнеката аммония, и далее проводят все испытания по 8.4.2. При отклонении полученных результатов от измеренных в момент построения градуировочного графика более чем на 5 % строят новый градуировочный график по свежеприготовленным рабочим растворам холинхлорида.

8.4 Проведение испытания

8.4.1 Анализируемую пробу премикса массой 1-5 г, взвешенную с погрешностью ± 0,002 г, вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, приливают 50 см^3 дистиллированной воды, нагревают до 80 °С и встряхивают на аппарате 15 мин. Охлаждают колбу, объем доводят до метки дистиллированной водой и фильтруют через обеззоленный складчатый фильтр в стакан. Отбирают 5–20 см^3 фильтрата в колбу с притертой пробкой вместимостью 25–100 см^3, приливают 10 см^3 раствора фосфорнокислого натрия и 5 см^3 раствора рейнеката аммония.

8.4.2 Колбу с содержимым встряхивают и оставляют на 2 ч в холодильнике при температуре 4 °С. После выпадения кристаллов холинхлорида раствор фильтруют на воронке Шотта № 2 с асбестовым слоем, используя вакуумный насос. Кристаллы, оставшиеся на фильтре, промывают 4–5 раз порциями по 5 см^3 охлажденного изопропилового спирта. Воронку переставляют в другую колбу и растворяют кристаллы ацетоном, приливая его в три приема по 7 см^3, каждый раз осторожно размешивая верхний асбестовый слой с осадком.

Содержимое колбы фильтруют в мерную колбу вместимостью 25 см^3. Доводят объем в колбе до метки ацетоном. Интенсивность окрашенных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром или на спектрофотометре при длине волны 526 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно ацетона.

8.5 Обработка результатов

Массовую долю холинхлорида в премиксе, X, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{m_1 \cdot V \cdot 10^{-3}}{m \cdot V_1 \cdot 10^{-6}}, \qquad (5)$$

где m_1 – масса холинхлорида, найденная по градуировочному графику, мг;

V – общий объем экстракта, см^3;

10^{-3} – коэффициент пересчета милиграммов в граммы;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

V_1 – объем анализируемого раствора, взятый для испытания, $см^3$;

10^{-6} – коэффициент пересчета граммов в тонну.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.1 настоящего стандарта.

9 Определение содержания витамина В5 (никотиновой кислоты) колориметрическим методом

9.1 Сущность метода заключается в кислотном гидролизе связанных форм витамина B_5 (никотиновой кислоты), очистке гидролизата, получении окрашенного раствора и колориметрическом определении в сравнении со стандартным раствором.

Метод применим в диапазоне измерений содержания витамина B_5 в премиксе от 100 до 3000 г/т.

9.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Фотоэлектроколориметр со спектральным диапазоном от 200 до 2000 нм или спектрофотометр со спектральным диапазоном от 186 до 1100 нм.

Баня водяная.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Баня ледяная.

Воронка Бюхнера № 3 или № 4 по ГОСТ 9147.

Палочки стеклянные.

Стаканы химические В(Н)-1-1000(2000) по ГОСТ 25336.

Склянки из темного стекла.

Фильтры обеззоленные (красная и синяя ленты).

Колбы мерные 2-100(500, 1000)-1(2) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 4(5)-1(2)-2, 6(7)-1(2)-5(10,25) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Пробирки с притертой пробкой П-1(2)-15-0,2 ХС по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1(2, 3, 4)-50(100, 500) по ГОСТ 1770.

Бром по ГОСТ 4109.

Калий роданистый по ГОСТ 4139 или аммоний роданистый по ГОСТ 27067, растворы с массовой долей 1 % и 10 %.

Кальций углекислый по ГОСТ 4530.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации $c(HCl) = 0,5$ моль/$дм^3$ (0,5 н.).

Кислота серная по ГОСТ 4204, растворы с молярными концентрациями $c(½\ H_2SO_4) = 2$ моль/$дм^3$ и $c(½\ H_2SO_4) = 10$ моль/$дм^3$.

Витамин B_5 (никотиновая кислота) с массовой долей не менее 99,0 %.

Метол по ГОСТ 25664, раствор с массовой долей 6 %.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, растворы молярных концентраций $c(NaOH) = 4$ моль/$дм^3$ и $c(NaOH) = 10$ моль/$дм^3$.

Спирт этиловый ректификованный технический объемной долей 96 % по ГОСТ 18300.

Уголь активный по ГОСТ 6217.

Фенолфталеин.

Цинк сернокислый по ГОСТ 4174, раствор с массовой долей 80 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

9.3 Подготовка к испытанию

9.3.1 Перекристаллизация метола

500 $см^3$ раствора серной кислоты молярной концентрации $c(½\ H_2SO_4) = 0,1$ моль/$дм^3$ нагревают до кипения, добавляют 100 г метола и снова доводят до кипения. Если раствор сильно окрашен, к нему добавляют 10 г активного угля. Кипящий раствор быстро фильтруют через предварительно нагретую (кипящей водой) воронку Бюхнера, фильтрат переносят в химический стакан вместимостью

2000 см^3, приливают 700 см^3 этилового спирта, размешивают, помещают в ледяную баню и оставляют на несколько часов в темном месте.

Выпавшие в осадок кристаллы отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают на фильтре 2–3 раза этиловым спиртом порциями по 30–40 см^3 и высушивают на воздухе в темном месте.

Подготовленный метол хранят в склянке из темного стекла в холодильнике при температуре 4 °С – 5 °С до тех пор пока он сохраняет свою окраску.

9.3.2 Приготовление раствора метола

(8,000 ± 0,001) г г перекристаллизированного метола вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки раствором соляной кислоты молярной концентрации c(НС1) = 0,5 моль/дм^3.

Раствор готовят непосредственно перед проведением испытания.

9.3.3 Приготовление бромной воды

В темную склянку с притертой пробкой наливают 100 см^3 дистиллированной воды, добавляют в вытяжном шкафу от 4 до 5 см^3 брома, хорошо встряхивают и оставляют на 1–3 сут для лучшего насыщения воды бромом. Бромную воду охлаждают в ледяной бане в течение 30 мин.

Срок хранения бромной воды в склянке из темного стекла в защищенном от света эксикаторе в вытяжном шкафу – 3 мес.

9.3.4 Приготовление роданбромидного раствора

К 30 см^3 охлажденной бромной воды (см. 9.3.3) по каплям прибавляют раствор роданистого калия или роданистого аммония с массовой долей 10 % до светло-желтого окрашивания. Затем по каплям прибавляют растворы этого же реактива с массовой долей 1 % до полного обесцвечивания бромной воды. К обесцвеченному раствору постепенно, небольшими порциями, по 20–50 мг, добавляют углекислый кальций до прекращения выделения пузырьков газа.

Раствор фильтруют от осадка через обеззоленный фильтр с синей лентой в склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в холодильнике.

Раствор готовят непосредственно перед проведением испытания.

9.3.5 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_5

(0,500 ± 0,001) г витамина B_5 помещают в мерную колбу вместимостью 500 см^3, добавляют 200 см^3 дистиллированной воды, 5 см^3 раствора серной кислоты молярной концентрации c(½ H_2S0_4) = 10 моль/дм^3 и после раст-ворения кристаллов доводят объем дистиллированной водой до метки.

Массовая концентрация основного стандартного раствора витамина B_5 – 1000 мкг/см^3.

Срок хранения раствора в холодильнике при температуре 4 °С - 5 °С – не более 6 мес.

9.3.6 Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_5

5 см^3 основного стандартного раствора витамина B_5 (см. 9.3.5) разводят дистиллированной водой в колбе вместимостью 1000 см^3, объем доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Массовая концентрация рабочего стандартного раствора витамина B_5 – 5 мкг/см^3.

Раствор готовят в день проведения испытания.

9.4 Проведение испытания

Анализируемую пробу премикса массой (5,000 ± 0,001) г помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, омывая горлышко колбы 60–65 см^3 раствором серной кислоты молярной концентрации c(½ H_2S0_4) = 2 моль/дм^3. Содержимое перемешивают и колбу помещают в кипящую водяную баню на 40 мин, периодически перемешивая содержимое. По окончании гидролиза колбу охлаждают до комнатной температуры, доводят объем до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 5–10 см^3 фильтрата.

Отбирают 10–20 см^3 фильтрата в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой. Затем 25 см^3 полученного раствора помещают в цилиндр вместимостью 50 см^3, добавляют

1–2 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют, внося по каплям раствор гидроокиси натрия молярной концентрации c(NaOH) = 10 моль/дм^3 до полу-чения слабо-розового окрашивания. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации c(½ H_2S0_4) = 2 моль/дм^3, добавляя по каплям до исчезновения розового окрашивания. Раствор охлаждают, добавляют 2 см^3 раствора сернокислого цинка и 1–2 капли этилового спирта (для устранения пены).

Из пипетки по каплям добавляют раствор гидроокиси натрия молярной концентрацией c(NaOH) = 4 моль/дм^3, одновременно перемешивая палочкой до образования осадка и появления бледно-розового окрашивания раствора. Избыток щелочи нейтрализуют, внося по каплям раствор серной кислоты молярной концентрации c(½ H_2S0_4) = 2 моль/дм^3 до исчезновения розового окрашивания, и оставляют стоять в течение 10 мин, периодически перемешивая. Палочку вынимают, обмывают над цилиндром дистиллированной водой и доводят объем раствора до 50 см^3, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

Цветную реакцию проводят в восьми пробирках с притертыми пробками:

- в пробирку 1 вносят 5 см^3 дистиллированной воды (контроль на реактивы);
- в пробирки 2–4 вносят по 5 см^3 рабочего стандартного раствора витамина B_5 (см. 9.3.6);
- в пробирки 5, 6 вносят по 5 см^3 полученного фильтрата;
- в пробирки 7, 8 вносят по 5 см^3 полученного фильтрата с поправкой на аминореагирующие вещества.

Все пробирки, кроме 7, 8, помещают на 5 мин в водяную баню при тем-пературе (50 ± 2) °С. После этого в пробирки 7, 8 вносят по 2 см^3 дистил-лированной воды, а во все остальные пробирки – по 2 см^3 роданбромидного раствора (см. 9.3.4) в вытяжном шкафу. Пробирки закрывают пробками, перемешивают и помещают в водяную баню при температуре (50 ± 2) °С на 10 мин. По истечении этого времени пробирки вынимают, охлаждают водой до комнатной температуры и ставят на 10 мин в темное место. Затем в каждую пробирку приливают по 3 см^3 раствора метола (см. 9.3.2), перемешивают и оставляют на 1 ч в темном месте при комнатной температуре. По истечении этого времени растворы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, если они мутные, и колориметрируют на фотоэлектроколориметре (синий светофильтр) или спектрофотометре при длине волны 400–440 нм в кювете толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно дистиллированной воды.

***9.5* Обработка результатов**

Массовую долю витамина B_5 в премиксе, X, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot V \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot m_1 \cdot 10^{-6}}{(A_2 - A_3) \cdot m \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 \cdot 10^{-6}}, \qquad (6)$$

где A, A_1 – оптические плотности анализируемых растворов 5, 6 и растворов 7, 8 соответственно (среднеарифметические значения двух определений), е.о.п. или мм;

V – объем гидролизата, см^3;

V_2 – объем разведенного фильтрата, см^3;

V_4 – объем раствора после обработки сернокислым цинком, см^3;

m_1 – масса витамина B_5 в измеряемом рабочем стандартном растворе, мкг;

A_2 – оптическая плотность стандартных растворов 2, 3, 4 (среднееарифметическое значение трех определений), е.о.п. или мм;

A_3 – оптическая плотность раствора *1,* е.о.п. или мм;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

V_1 – объем фильтрата, взятый на разведение, см^3;

V_3 – объем гидролизата, взятый на обработку сернокислым цинком, см^3;

V_5 – объем фильтрата, взятый для проведения цветной реакции, см^3;

10^{-6} – коэффициенты пересчета микрограммов в граммы и граммов втонну.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.1 настоящего стандарта.

10 Определение содержания витамина В5 (никотиновой кислоты) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

10.1 Сущность метода заключается в экстракции витамина B_5 (никотиновой кислоты) из анализируемой пробы премикса раствором соляной кислоты и последующем определении его содержания с помощью жидкостного хроматографа.

Метод применим в диапазоне измерений содержания витамина B_5 в премиксе от 200 до 4000 г/т.

10.2 Метод с использованием раствора соляной кислоты молярной концентрации *c*(HCl) = 0,01 моль/дм^3

10.2.1 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный, укомплектованный спектрофото-метрическим детектором, пригодным для измерения оптической плотности в диапазоне длин волн от 200 до 300 нм, самописцем или интегратором, позволяющим измерять высоту и площадь пиков, и компьютером с установленным программным обеспечением для обработки результатов измерений. Допускается использовать детектор при постоянной длине волны 254 нм.

Колонка хроматографическая стальная или стеклянная высотой 150–200 мм и диаметром 2,6–4,6 мм с числом теоретических тарелок не менее 3000 на 1 м, заполненная одним из следующих сорбентов: Силасорб С-18 или Сепарон С-18 с зернением 7,5 мкм.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Центрифуга лабораторная с числом оборотов не менее 6000 в мин.

Колбы мерные 2-50(100)-1(2) по ГОСТ 1770.

Иономер со стеклянным электродом с пределом допускаемой погрешности ± 0,05 ед. pH.

Пипетка 4-1(2)-1 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Ацетонитрил.

Тетрабутиламмоний хлористый или тетрабутиламмоний бромистый.

Витамин B_5 (никотиновая кислота) с массовой долей не менее 99,0 %.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации $c(HCl) = 0{,}01$ моль/дм^3.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Склянка с притертой пробкой.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

10.2.2 Подготовка к испытанию

10.2.2.1 Приготовление элюента для хроматографии

В колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают 120 см^3 ацетонитрила с 880 см^3 дистиллированной воды, добавляют (2,000 ± 0,001) г хлористого (бромистого) тетрабутиламмония. Полученную смесь фильтруют через бумажный фильтр для удаления механических примесей и переносят в склянку с притертой пробкой. Срок хранения элюента – не более 1 мес.

10.2.2.2 Приготовление раствора экстрагента по 7.3.2

10.2.2.3 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_5

(0,100 ± 0,001) г витамина B_5 растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Массовая концентрация основного стандартного раствора витамина B_5 - 1 мг/см^3.

Срок хранения раствора в холодильнике при температуре 4 °С – 5 °С – не более одного года.

10.2.2.4 Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_5

Рабочий стандартный раствор витамина B_5 готовят из основного стандартного раствора (см. 10.2.2.3), разбавляя его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемого содержания витамина B_5 в премиксе в соответствии таблице 1. Рабочий стандартный раствор готовят в день проведения испытания.

Таблица 1

Предполагаемое содержание витамина B_5 в 1 кг премикса, г	Массовая концентрация рабочего стандартного раствора, мг/см^3	Объем основного стандартного раствора, необходимый для разбавления, см^3	Вместимость мерной колбы для разбавления, см^3
Менее 1	0,01	1	100
От 1 до 2 включ.	0,02	1	50
Св. 2 до 3 «	0,04	2	50

10.2.3 Проведение испытания

10.2.3.1 Экстрагирование

Для определения содержания витамина B_5 в премиксе проводят два параллельных испытания, начиная со взвешивания пробы.

(1,000 ± 0,001) г анализируемой пробы премикса помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, приливают до ⅔ объема колбы раствор соляной кислоты молярной концентрации $c(HCl) = 0{,}01$ моль/дм^3, перемешивают и оставляют стоять в течение 20 мин, несколько раз при этом перемешивая, после чего доводят объем до метки тем же раствором. Полученную суспензию перемешивают и часть отливают в центрифужную пробирку, центрифугируют в течение 5 мин при 6000 об/мин. Полученный экстракт используют для хроматографирования.

10.2.3.2 Хроматографирование

Хроматографирование осуществляют при следующих условиях:

- колонка хроматографическая, заполненная сорбентом;
- подвижная фаза – элюент по 10.2.2.1;
- рабочая длина волны спектрофотометрического детектора 262 нм (или 254 нм);
- скорость элюирования – 1,5 $см^3$/мин.

При данных условиях проводят 3–5 загрузок рабочего стандартного раствора (см. 10.2.2.4) по 5 $мм^3$, отмечая время выхода пика витамина B_5 в секундах и высоту пика относительно линии, проведенной в основании пика. При достижении постоянной высоты пика приступают к проведению испытания.

Загружают экстракт премикса (см. 10.2.3.1) и рабочий стандартный раствор витамина B_5 (см. 10.2.2.4) в зависимости от предполагаемого содержания его в премиксе в следующих объемах:

- 5 $мм^3$ – при массовой концентрации раствора 0,040 мг/$см^3$;
- 10 $мм^3$ – при массовой концентрации от 0,01 до 0,02 мг/$см^3$.

По времени выхода определяют пики витамина B_5 в экстракте и в рабочем стандартном растворе, измеряют высоту пиков, как расстояние от вершины пика до линии, проведенной в основании пика (см. приложение А, рисунок А.3). Загрузку экстракта премикса и рабочего стандартного раствора осуществляют по три раза и находят среднеарифметическое значение высоты пиков.

10.2.4 Обработка результатов

Массовую долю витамина B_5 в премиксе, X, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_{ст} \cdot h_x \cdot V \cdot 10^{-6}}{h_{ст} m \cdot 10^{-6}}, \qquad (7)$$

где $C_{ст}$ – массовая концентрация витамина B_5 в рабочем стандартном растворе, мкг/$см^3$;

h_x, $h_{ст}$ – высоты пиков витамина B_5 на хроматограммах анализируемого ирабочего стандартного раствора соответственно, е.о.п. или мм;

V – общий объем экстракта, $см^3$;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

10^{-6} – коэффициенты пересчета микрограммов в граммы и граммов в тонну.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.1 настоящего стандарта.

10.3 Метод с использованием раствора соляной кислоты молярной концентрации c(HCl) = 0,1 моль/$дм^3$

10.3.1 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный микроколоночный типа «Милихром», укомплектованный спектрофотометрическим детектором, пригодным для измерения оптической плотности в диапазоне длин волн от 190 до 360 нм, самописцем или интегратором, позволяющим измерять высоту и площадь пиков, и компьютером с установленным программным обеспечением для обработки результатов измерений.

Колонка хроматографическая размером 2 × 120 мм с числом теорети-ческих тарелок не менее 4000, заполненная одним из сорбентов: Силасорб С-18, Силасорб SPHC-18, Сепарон С-18.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Колбы конические Кн-100(200) по ГОСТ 19908.

Баня водяная с терморегулятором.

Пипетки 2-1(2)-1(5,10) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Колбы мерные 2-50(100,200)-1(2) по ГОСТ 1770.

Воронка ВФ-1-40-ПОР 16 ХС по ГОСТ 25336.

Склянки с притертыми пробками.

Воронка 71 по ГОСТ 19908.

pH-метр любого типа с пределом допускаемой погрешности ± 0,1 ед. pH.

Цилиндры 2-50(100) по ГОСТ 1770.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 40 %.

Кислота серная по ГОСТ 4204, раствор молярной концентрации c(½ H_2S0_4) = 5 моль/$дм^3$.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, с массовой долей 95 %.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации c(HC1) = 0,1 моль/$дм^3$.

Витамин B_5 (никотиновая кислота) с массовой долей не менее 99,0 %.
Фенолфталеин.
Триметиламин.
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания
1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

10.3.2 Подготовка к испытанию

10.3.2.1 Приготовление элюента для хроматографии

Трехкомпонентный элюент готовят смешиванием уксусной кислоты, дистиллированной воды и триметиламина в соотношении 3 : 95 : 2 по объему. Для этого в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ вносят пипеткой 15 $см^3$ концентрированной уксусной кислоты, затем цилиндром вносят 100 $см^3$ дистиллированной воды и перемешивают. Добавляют 10 $см^3$ триметиламина, перемешивают, доводят объем до метки дистиллированной водой и снова тщательно перемешивают. Приготовленный раствор фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16 и помещают в склянку с притертой пробкой.

Срок хранения элюента в холодильнике при температуре 4 °С – 5 °С – не более 1 мес.

10.3.2.2 Подготовка хроматографической колонки

Через колонку пропускают элюент в количестве 20-30 свободных объемов колонки, т. е. два полных шприца насоса хроматографа при расходе элюента сначала 50 $мм^3$/мин, а затем 100 $мм^3$/мин. Промывку колонки заканчивают при получении стабильной нулевой линии.

После стабилизации колонки проводят ее насыщение витамином B_5. Для насыщения колонки в начале работы проводят от трех до пяти загрузок рабочего стандартного раствора и отмечают высоты пиков. При достижении постоянной высоты приступают к испытаниям.

10.3.2.3 Приготовление раствора серной кислоты молярной концентрации $c(½\ H_2S0_4)$ = 5 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 30–40 $см^3$ дистиллированной воды и добавляют 14,2 $см^3$ концентрированной серной кислоты. Осторожно перемешивают и добавляют еще 35–40 $см^3$ дистиллированной воды. Когда раствор остынет до комнатной температуры, осторожно доводят объем дистиллированной водой до метки.

10.3.2.4 Построение градуировочного графика

В коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ помещают 0,1 г витамина B_5 и приливают 70 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрации c(НС1) = 0,1 моль/$дм^3$. Колбу помещают в водяную баню и нагревают в течение 10 мин при температуре 75 °С. Затем ее охлаждают, добавляют1–2 капли 1 %–ного спиртового раствора фенолфталеина, по каплям раствор

гидроокиси натрия с массовой долей 40 % до образования розового окрашивания. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации $c(½\ H_2S0_4)$ = 5 моль/$дм^3$. Раствор фильтруют через бумажный фильтр с синей лентой в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Получают основной стандартный раствор витамина B_5 массовой концентрации 1 мг/$см^3$.

Из этого раствора готовят рабочие стандартные растворы, содержащие 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 и 3,0 мг витамина B_5 в 50 $см^3$. Для этого соответственно 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 и 3,0 $см^3$ основного стандартного раствора помещают в шесть мерных колб вместимостью 50 $см^3$ и доводят их объемы до метки дистиллированной водой.

Срок хранения рабочих стандартных растворов в холодильнике в склянках с притертыми пробками при температуре 4 °С – 5 °С – не более 1 мес.

Рабочие стандартные растворы анализируют на жидкостном хроматографе при следующих условиях:

- хроматографическая колонка размером 2 × 120 мм, заполненная сорбентом;
- трехкомпонентный элюент на основе уксусной кислоты (см. 10.3.2.1);
- объем пробы – 6 $мм^3$;
- длина волны – 260 нм;
- скорость подачи элюента – 80–100 $мм^3$/мин;
- постоянная времени – 0,2 с.

Удерживаемый объем пика витамина B_5 – 560–580 $мм^3$ (может меняться в зависимости от размеров колонки и плотности ее заполнения). Каждый раствор хроматографируют два раза. После выхода пика колонку

промывают, прокачивая через нее 150–200 мм^3 элюента до выхода на нулевую линию.

Значения средних высот хроматографических пиков (в единицах оптической плотности, е. о. п., или в миллиметрах) откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс - массы витамина B_5 в 50 см^3 раствора.

Построение градуировочных графиков можно заменить расчетом коэффициента наклона *K*, мкг/е.о.п. или мкг/мм, по формуле

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_i}{n}, \qquad (8)$$

где *n* – количество точек, по которым строится градуировочный график;

K_i – коэффициент наклона градуировочного графика для *i*-го градуиро-вочного раствора, мкг/е.о.п. или мкг/мм.

Значение коэффициента наклона градуировочного графика *для i-го* градуировочного раствора K_i, мкг/е.о.п. или мкг/мм, вычисляют по формуле

$$K_i = \frac{C_i}{h_i}, \qquad (9)$$

где C_i – содержание витамина в соответствующем *i*-ом градуировочномрастворе, мкг;

h_i – высота *i*-го хроматографического пика, е.о.п. или мм.

10.3.2.5 Проверка градуировочного графика

Градуировочный график контролируют не реже 1 раза в неделю. Для этого проводят процедуру построения градуировочного графика по 10.3.2.4 для 1–2 рабочих стандартных растворов витамина B_5. Отклонение полученных результатов от измеренных в момент построения градуировочного графика *a*, %, определяют по формуле

$$a = \frac{h_1 - h_2}{h_1} \cdot 100, \qquad (10)$$

где h_1, h_2 – высоты хроматографических пиков, определенные при построении градуировочного графика и в момент проверки соответственно, е. о. п. или мм;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

При отклонении результатов более чем на 5 % строят новый градуиро-вочный график.

10.3.3 Проведение испытания

10.3.3.1 Проведение кислотного гидролиза

1–5 г анализируемой пробы премикса, взвешенную с погрешностью ± 0,001 г, помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3 и добавляют 30 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации *c*(HC1) = 0,1 моль/дм^3. Колбу нагревают на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С в течение 10 мин, затем охлаждают под струей холодной воды, добавляют 1–2 капли спиртового раствора фенолфталеина с массовой долей 1 % и раствор гидроокиси натрия с массовой долей 40 % до образования розового окрашивания. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации *c*(½ H_2SO_4) = 5 моль/дм^3. Выдерживают раствор 10 мин, фильтруют через обеззоленный фильтр с синей лентой в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки дистиллированнои водой.

10.3.3.2 Хроматографирование

Полученный экстракт хроматографируют, по 10.3.2.4. Для определения содержания витамина B_5 в премиксах проводят два параллельных определения, начиная со взвешивания анализируемой пробы. Каждый экстракт хроматографируют два раза, находят средне– арифметическое значение высоты пиков в единицах оптической плотности или миллиметрах и по градуировочному графику определяют содержание витамина B_5 в микрограммах (см. приложение А, рисунок А.4).

10.3.4 Обработка результатов

Массовую долю витамина B_5 в премиксе, *X*, *г/т*, вычисляют по формуле

$$X = \frac{m_1 \cdot 10^{-6}}{m \cdot 10^{-6}}, \qquad (11)$$

где m_1 – содержание витамина B_5, найденное по градуировочному графику, мкг;
m – масса анализируемой пробы премикса, г;
10^{-6} – коэффициенты пересчета микрограммов в граммы и граммов в тонну.

При использовании коэффициента наклона K по формуле (9) вместо градуировочного графика массовую долю витамина B_5 в премиксе, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{K \cdot A \cdot 10^{-6}}{m \cdot 10^{-6}}, \qquad (12)$$

где K – коэффициент наклона градуировочного графика, мкг/е. о. п. или мкг/мм;
A – высота хроматографического пика, е. о. п. или мм;
m – масса анализируемой пробы премикса, г;
10^{-6} – коэффициенты пересчета микрограммов в граммы и граммов в тонну.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.1 настоящего стандарта.

11 Контроль точности результатов определений

11.1 Приемлемость результатов определений, полученных в условиях повторяемости (сходимости)

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных независимых определений, полученными одним и тем же методом на одной лабораторной пробе в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором на одном и том же экземпляре оборудования в течение короткого промежутка времени при доверительной вероятности P = 0,95, не должно превышать предела повторяемости (сходимости), r, приведенного в таблице 2.

11.2 Приемлемость результатов определений, полученных в условиях воспроизводимости

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных определений, полученными одним и тем же методом на лабораторной пробе в разных лабораториях разными операторами на различных экземплярах оборудования при доверительной вероятности P = 0,95, не должно превышать предела воспроизводимости, R, приведенного в таблице 2.

Если расхождение между результатами параллельных определений превышает предел повторяемости, то анализ повторяют, начиная со взвешивания анализируемой пробы.

Если расхождение между результатами параллельных определений вновь превышает предел повторяемости, выясняют и устраняют причины плохой повторяемости результатов анализа.

Таблица 2 - Метрологические характеристики определения содержаниявитаминов B_1, B_2, холинхлорида, B_5.

В граммах на 1 т

Наименование определяемого показателя	Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений (предел повторяемости), r	Допускаемое расхождение между результатами определений в двух разных лабораториях (предел воспроизводимости), R
Массовая доля витамина B_1	$0{,}1\cdot\bar{x}_{B_1}$	$0{,}15\cdot\overline{X}_{B_1}$
Массовая доля витамина B_2	$0{,}1\cdot\bar{x}_{B_2}$	$0{,}15\cdot\overline{X}_{B_2}$
Массовая доля холинхлорида	$0{,}1\cdot\bar{x}_{x}$	$0{,}15\cdot\overline{X}_{x}$
Массовая доля витамина B_5	$0{,}1\cdot\bar{x}_{B_5}$	$0{,}15\cdot\overline{X}_{B_5}$

Примечания

$\bar{x}_{B_1}$, $\overline{X}_{B_1}$ - среднеарифметические значения результатов определений содержания витамина B_1, г/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости;

$\bar{x}_{B_2}$, $\overline{X}_{B_2}$ - среднеарифметические значения результатов определений содержания витамина B_2, г/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости;

$\bar{x}_{x}$, $\overline{X}_{x}$ - среднеарифметические значения результатов определений содержания холинхлорида, г/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости.

$\bar{x}_{B_5}$, $\overline{X}_{B_5}$ - среднеарифметические значения результатов определений содержания витамина B_5, г/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости.

12 Требования безопасности при проведении испытаний

12.1 Работы с концентрированными кислотами, щелочами и др. летучими веществами проводят в вытяжном шкафу.

12.2 При проведении испытаний необходимо соблюдать требования электробезопасности по ГОСТ 12.2.007.0.

13. Требования к условиям измерений и квалификации операторов

13.1 При подготовке и проведении испытаний в помещении должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды . . . . . от 15 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . .от 40 % до 90 %;
- атмосферное давление . . . . . от 84 до 106 кПа;
- напряжение в электросети . . . . . (220 ± 20) °С.

13.2 К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, имеющие высшее или среднее специальное химическое образование или опыт работы в химической лаборатории, владеющие техникой проведения анализа и изучившие инструкции по эксплуатации приборов.

Приложение А
(рекомендуемое)

Примеры хроматограмм определения витаминов группы В

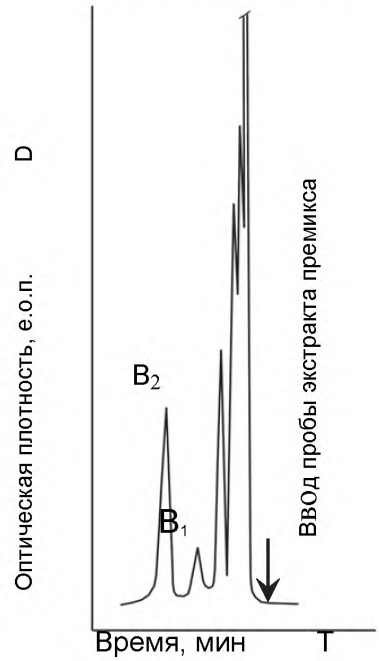

Рисунок А.1 – Хроматограмма экстракта витаминов B_1 и B_2 из премикса

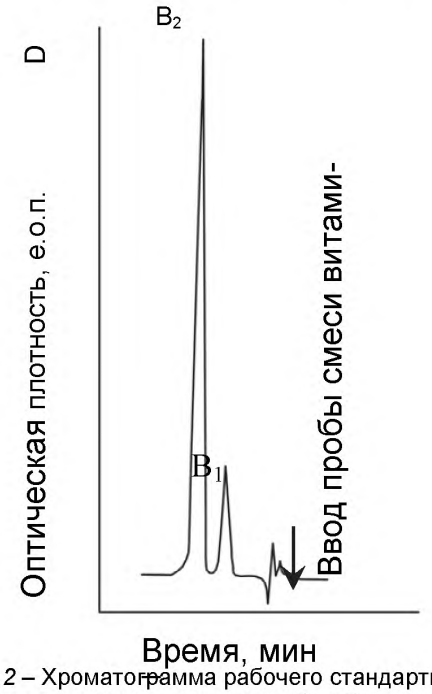

Рисунок *А.2* – Хроматограмма рабочего стандартного раствора смеси витаминов B_1 и B_2

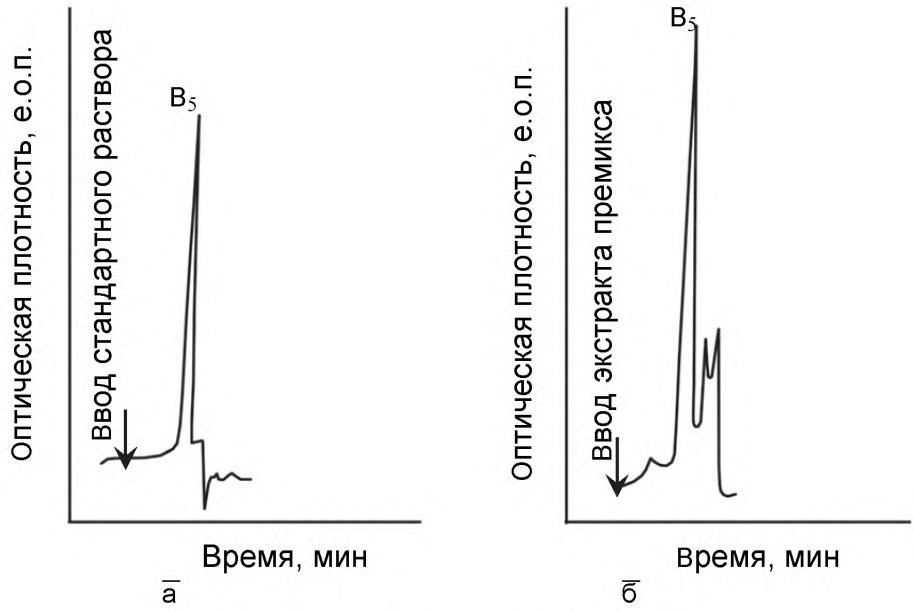

Рисунок *А.3* – Хроматограммы витамина B_5 :
а – рабочего стандартного раствора, б - экстракта из премикса

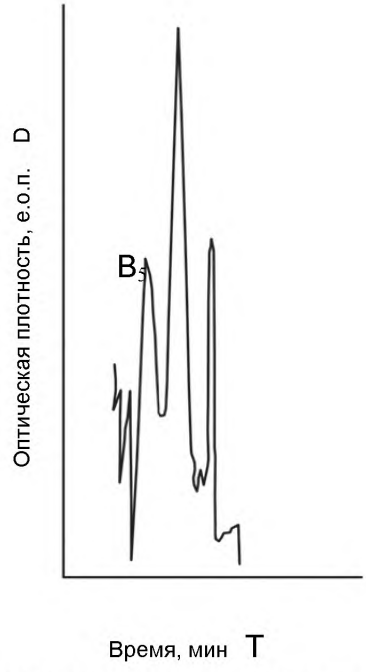

Рисунок *А.4* – Хроматограмма экстракта витамина B_5 из премикса

УДК 636.085.3:006.354 МКС 65.120

Ключевые слова: премиксы, метод контроля, витамины группы В (B_1, B_2, холинхлорид, B_5), экстракция, флуоресценция, колориметрия, высокоэффективная жидкостная хроматография

Подписано в печать 05.11.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,79. Тираж 72 экз. Зак. 4008.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru